

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/085425 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/06, 5/08, 5/10, 15/09, C12P 33/00, A01K 67/027 (74) 代理人: 下田 昭 (SHIMODA, Akira); 〒1040031 東京都中央区京橋 3-3-4 京橋日英ビル 4 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002548 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 18 日 (18.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2004-058406 2004 年 3 月 3 日 (03.03.2004) JP (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町 4-1-8 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮本 薫 (MIYAMOTO, Kaoru) [JP/JP]; 〒9100337 福井県坂井郡丸岡町新鳴鹿 2 丁目 1 1 1 A 4-3 0 4 Fukui (JP). 矢澤 隆志 (YAZAWA, Takashi) [JP/JP]; 〒9101106 福井県吉田郡松岡町御公領 5 0 4-1 アネックス 医大前 3 0 5 Fukui (JP). 梅澤 明弘 (UMEZAWA, Akihiro) [JP/JP]; 〒1570074 東京都世田谷区大蔵 2-1 1-2-7 0 6 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DIFFERENTIATING MESENCHYMAL STEM CELLS INTO STEROID-PRODUCING CELLS

(54) 発明の名称: 間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる方法

(57) Abstract: [PROBLEMS] To regulate the differentiation of a mesenchymal stem cell line originating in bone marrow into steroid-producing cells. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] Mesenchymal stem cells can be differentiated into steroid-producing cells by stimulating the mesenchymal stem cells with a transcription factor (SF-1), preferably the transcription factor (SF-1) together with cAMP. Namely, a method of differentiating mesenchymal stem cells into steroid-producing cells by stimulating the mesenchymal stem cells with the transcription factor (SF-1). Use may be also made of cAMP in the stimulation.

(57) 要約: 【課題】 骨髄由来の間葉系幹細胞株のステロイド産生細胞への分化を制御する。【解決手段】 間葉系幹細胞を転写因子 (SF-1)、好ましくは転写因子 (SF-1) 及び cAMP で刺激すると、間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させることが出来る。本発明は、間葉系幹細胞を転写因子 (SF-1) で刺激することから成る、骨髄由来の間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる方法である。更に cAMP で刺激してもよい。

WO 2005/085425 A1

明 細 書

間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる方法

技術分野

[0001] この発明は、間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる方法に関する。

背景技術

[0002] 間葉系幹細胞は、in vivoで胚葉を越えて非常に幅広い分化能を持つことが知られている(非特許文献1〜3)。この細胞が成体でも採取可能であり、なおかつ胚性幹細胞と異なり分化した後も細胞の株化が容易であることから、今後、発生・再生の分野で重要な役割を担っていくことが期待されている。

既に間葉系幹細胞を脂肪細胞、軟骨細胞又は骨芽細胞に分化させる方法については検討が行われている(特許文献1)。

[0003] 特許文献1:WO2002/022788

非特許文献1:J Clin Invest.10, 697-705, 1999

非特許文献2:Exp Cell Res. 288, 51-9, 2003

非特許文献3:Biochem Biophys Res Commun. 295, 354-61, 2002

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明者らは、骨髓由来の間葉系幹細胞株のステロイド産生細胞への分化を制御する手段を見出した。本発明の方法は、発生・再生の分野で極めて有用な方法になると考えられる。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、マウスの骨髓間葉系幹細胞を精巢に移植すると、ステロイドホルモン産生細胞であるLeydig細胞に分化することを見出した(実施例4参照)。更に、マウス骨髓由来の間葉系幹細胞株KUM9を培養すると、極わずかな割合ではあるが、自発的にステロイド産生細胞に分化することを発見したが、同時に転写因子SF-1の発現も観察した(実施例5参照)。そこで、SF-1を恒常的に発現させるKUM9誘導株を作製し、さらにそこにcAMPの刺激を加えたところ、安定的にステロイドホルモンを産

生することがわかった(実施例1、2参照)。更に、ヒト細胞株では性腺ステロイドだけでなく副腎ステロイド産生酵素群も誘導されていることを確認した(実施例3参照)。これは、ヒトのステロイドホルモン欠損症の治療に幹細胞の分化を利用する際の基礎的データであり、再生治療に有用な方法であるものと考えられる。

以上の結果から、発明者らは、間葉系幹細胞を転写因子(SF-1)、好ましくは転写因子(SF-1)及びcAMPで刺激すると、間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させることが出来ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0006] 即ち、本発明は、間葉系幹細胞を転写因子(SF-1)で刺激することから成る、骨髓由来の間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる方法である。更にcAMPで刺激してもよい。

この間葉系幹細胞が骨髓由来であることが好ましく、またこの間葉系幹細胞がヒト由来であることが好ましい。

また、本発明は、in vitroでこれらの方法を実施することから成るステロイド産生細胞の製法、又は間葉系幹細胞を哺乳類の生殖器官に移植することから成る上記いずれかのステロイド産生細胞の製法である。

更に、本発明は、これらの方法から得られるステロイド産生細胞であり、このステロイド産生細胞を有する非ヒト動物である。

発明の効果

[0007] 本発明は、間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞に分化させる手段を初めて提供するものである。

免疫の問題をクリアできれば、ブタなどの非ヒト動物の生殖腺に幹細胞を移植し、大量の分化した細胞を得ることが可能である。再生医療等で移植した細胞を分化した状態を保ったまま維持することが最も重要となるが、その方法を開発するためのツールとして、本発明の方法を用いることができる。再生医療の開発のためのモデル細胞となりうる。

発明を実施するための最良の形態

[0008] 間葉系幹細胞とは、間質由来で様々な細胞に分化することが可能な細胞であり、骨髓に限らず中胚葉起源の諸組織の間質その他の組織(例えば、腎臓、関節膜、羊

膜、臍帯血中)にも存在し、これらを利用することができる。

骨髄由来の間葉系幹細胞は、骨髄間質に存在して造血を支持する間質細胞であるが、成体になっても様々な細胞・組織への多分化能を有している。骨髄由来の間葉系幹細胞は、例えば、骨端に注射針を差し込み、PBSを注いで、骨髄の細胞を取り出し、その後、プラスチックシャーレに播いて接着させ、継代を繰り返すことにより、間葉系幹細胞を取り出すことができる。

[0009] 本発明の方法に用いる誘導因子である転写因子(SF-1)は生殖腺・副腎型のステロイドホルモン産出細胞に発現するオーファン核内レセプターであり、ステロイドホルモン産出酵素の転写を司ることが知られている(Endocrine Reviews vol.18, No.3, 361-377 (1997); The FASEB Journal vol.10 1569-1577 (1996))。SF-1は間葉系幹細胞と動物種が違っても、基本的に結合するDNAの標的配列が共通なため、同じ効果が得られるものと考えられる。

cAMPは、広く生物一般に存在し、その細胞内濃度は 10^{-6} ~ 10^{-7} M程度であり、標的細胞内の特定酵素の生成や代謝調節に関与し、さらに細胞の増殖や分化にも関係している。cAMPは、生殖腺及び副腎においてステロイドホルモン産生関連酵素の発現を誘導しステロイドホルモンの産出を促進するLH, ACTHのセカンドメッセンジャーである。

転写因子(SF-1)やcAMPで刺激する手段としては、直接この因子を間葉系幹細胞に接触させてもよいし、これを発現するようなベクターを用いてもよい。

[0010] 間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させるために、in vitroで間葉系幹細胞を誘導因子で刺激してもよいし、間葉系幹細胞を哺乳類の生殖器官に移植してもよい。

in vitroで行う場合、例えば、ヒト由来のものは10%FBS含有のDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、マウス由来のものは10%FBS含有のIMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 又はDMEMを培養液として用いてもよい。培養条件は通常の培養細胞と同じく温度37℃、CO₂濃度5%のインキュベーターで培養を行うことができる。

SF-1の濃度は細胞 1×10^5 細胞あたり約0.1~10 μ g、好ましくは1 μ g程度、cAMP

の濃度は約0.5ー2.0mM、好ましくは1mM程度である。

- [0011] 一方、間葉系幹細胞を哺乳類の生殖器官に移植すると、何らかの因子が細胞に働いて(器官移植の場合は、周囲の細胞との相互作用など)、SF-1が幹細胞に発現してくるようになり、SF-1を介してステロイドホルモン産生細胞に分化してくるものと考えられる。

間葉系幹細胞の分化においてcAMPは補助的なものである。また、cAMPは、濃度の違いはあれ、細胞内に必ず存在しており、cAMPの場合は外部から加えなくとも、何らかの原因で細胞内の濃度が上昇することもよくある。

- [0012] このようにしてステロイド産生細胞を得ることができるし、このようにして製造されたステロイド産生細胞からステロイドを得ることもできる。

間葉系幹細胞が分化するステロイド産生細胞として、副腎皮質細胞、卵巣顆粒膜細胞、卵巣夾膜細胞、精巣ライディッヒ細胞、精巣セルトリ細胞等が挙げられる。

ステロイドとして、プロゲステロン、アンドロゲン、エストロゲン、グルコルチコイド、ミネラルコルチコイドなど、コレステロールから合成されるすべてのステロイドホルモン等を得ることができる。

- [0013] 以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

ステロイドホルモン合成酵素の遺伝子発現は、表1に示すプライマーを用いたRT-PCRによって調べた。

[表1]

記号	酵素名	プライマー配列	配列番号
StAR	steroidogenic acute regulatory protein	F-GAAGGAAAGCCAGCAGGAGAACG	1
		R-CTCTGATGACACCACTCTGCTCC	2
P450scc	cholesterol side chain cleavage enzyme	F-CGCACAGTCCAGAACAACAAGCA	3
		R-CGGTTAGAGAAGGCAGGATAGAG	4
HSD3b	3- β hydroxysteroid dehydrogenase	F-GCAGACCATCCTAGATGTCAAT	5
		R-TCATCATAGCTTTGGTGAGG	6
P450c17	17- α -hydroxylase/17,20-lyase	F-AAAATAATAACACTGGGGAAGGC	7
		R-TGGGTGTGGGTGTAATGAGATGG	8
P450c21	steroid 21-hydroxylase	F-AGAGGATCCGCTTGGGGCTGC	9
		R-GGAGAATTCTTATGGATGGC	10
P45011b1	steroid 11- β -hydroxylase	F-TCACCAATGTATCAAGAATGTGT	11
		R-CCATCTGCACATCCTCTTTCTCTT	12
P45011b2	aldosterone synthase	F-CCAACAGATGTATCTGGAAGGTGC	13
		R-CCATCTGCACATCCTCTTGCTCA	14
GAPDH	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	F-ACCACAGTCCATGCCATCAC	15
		R-TCCACCACCCTGTTGCTGTA	16

実施例 1

[0014] pIRES-puro2ベクター(Clontech、図1)にラットSF-1遺伝子(Gene Bank NM_053344, 配列番号17)のコーディング領域(配列番号17の1-1389番目)を組み込み、Nru Iで直線化した後に確立されたマウス成体由来の間葉系幹細胞の細胞株であるKUM9(国立成育医療センター研究所生殖医療研究部から提供された。)にトランスフェクションした。48時間後にピュロマイシン($2 \mu\text{g/ml}$)入りの培地で選択を行い、2週間後に生き残った耐性コロニーをピックアップしクローン化した。

[0015] 親ベクターであるpIRES-puroをトランスフェクションしたクローン(図2B)はトランスフェクションを行わないKUM9(図2A)と同様の形態を示した。それに対しSF-1を発現するクローン(SF-7, SF-9)の細胞内にはステロイドホルモンの前駆体となるコレステロールを含むと考えられる多数の脂肪滴が観察された(図2C)。

各クローン(SF-7, SF-9)からタンパク質を抽出し、ウェスタンブローディングによりSF-1タンパク質の発現を調べたところ、SF-1タンパク質を検出した(図3)。

また、この細胞におけるステロイドホルモン合成酵素の遺伝子発現をRT-PCRによって調べた結果、P450sccが発現していることが観察された。

実施例 2

[0016] 次に実施例1でF-1の発現が観察されたクローン(SF-9)について、cAMP(1mM , SIGMA)を添加し7日間培養を行った。cAMP添加後、1, 3, 5, 7日に細胞よりRNAを抽出しRT-PCRによって遺伝子発現の変化を調べた。比較のため、親ベクタ

ー(pIRES)を用いて同様の操作を行った。

その結果、1日後にP450_{scc}が、3日後にはHSD3b1が、さらに5日後にはP450_{c17}の発現が誘導された(図4)。

ウェスタンブローディングの結果、mRNA同様にこれらの酵素のタンパク質も発現が誘導されていることが示された(図5)。

[0017] またこれらの結果は、SF-1を導入していない細胞(pIRES-puro)にcAMPを添加しても、ステロイドホルモン産生酵素が発現せず、ステロイドホルモンも作らず、cAMPのみではステロイドホルモン産生細胞に分化させられないことがわかる。

このことは、間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる際に、SF-1が必須の因子であり、cAMPが補助的な因子であることを示している。

[0018] また、3日、7日目の培養液を回収しステロイドホルモンの産出量をラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定した。その結果、mRNA並びにタンパク質の発現を反映し、cAMP添加群では3日目からプロジェステロン、そして7日目にはアンドロジェンが検出された(図6)。ステロイド合成酵素の誘導だけでなく、実際男性ホルモンの一種であるアンドロステンジオンも合成されていることが確認された。

HSD3b1の免疫染色の結果、すべての細胞が陽性であった(図7)。

実施例1と2の結果は、SF-1の強制発現により骨髓由来の間葉系幹細胞がステロイドホルモン産出細胞に分化することを示している。

実施例 3

[0019] 実施例2と同様の実験をヒト由来の細胞で行い、同じようにステロイドホルモン産出細胞ができることを調べた。

ヒト骨髓間葉系幹細胞由来のhMSCE6/E7(京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野より提供された。)に、リン酸カルシウム法により上記のpIRES-puro-SF-1ベクターのトランスフェクションを行った。48時間後にピュロマイシン(0.3 μ g/ml)入りの培地で選択を行い、2週間後に生き残った耐性コロニーをピックアップし、クローン化した。cAMPを添加して7日間培養した細胞からRNAを抽出し、RT-PCR法により遺伝子の発現を調べた。

[0020] pIRES-puro-SF-1を安定発現するhMSC細胞は、KUM9の時に観察されたような形

態変化(図2A-C)を示さなかった。

しかし、RT-PCRによる遺伝子発現解析の結果、StaR, P450_{scc}, 3 β -HSDといったステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の発現が観察された。さらにcAMP添加により副腎皮質においてグルココルチコイド産出に関わる酵素であるP450_{c21}とP450_{11 β 1}の発現が誘導された(図8)。

この結果、ヒトの骨髄由来の間葉系幹細胞がステロイドホルモン産出細胞に分化したことがわかる。

実施例 4

[0021] 本実施例では、骨髄由来の間葉系幹細胞を精巣に移植した。

5週齢オスGreenラット(日本SLC株式会社)の手足の長骨の骨端に26ゲージの注射針を差し込み、PBSのそそぎ込みによって骨髄の細胞を抽出した。赤血球を浸透圧ショックによって破壊した後、20%FBS含有 α -MEM培地に 5×10^7 /100mm²シヤーレの細胞密度で播いた。24時間後に培地を交換し、非接着細胞を除去した。3日後に0.25%トリプシンを使い、細胞をはがして継代を行い、さらに1週間培養した。これにより骨髄由来の細胞のうち間葉系幹細胞が濃縮された。コンフルエントに達した細胞をトリプシンではがした後に、50 μ lのPBS中に 1×10^6 の細胞を懸濁し、これを3週齢のオスSprague Dawleyラット(日本チャールズリバー社)の精巣に注射した。

3週間後に精巣を摘出し倒立顕微鏡で観察した後に、4%パラフォルムアルデヒドに固定した。凍結切片を作製し免疫組織化学に用いた。一次抗体にウサギ抗ラットP450_{scc}抗体(CHEMICON)とマウス抗GFP抗体(MBL)、二次抗体にCy3結合抗ウサギIgG抗体(SIGMA)とFITC結合抗マウスIgG(SIGMA)を使い二重染色を行った。

[0022] Greenラット骨髄由来と考えられるGFP陽性の細胞は、移植から3週間後の精巣に存在しており、倒立蛍光顕微鏡下で容易に検出することができた(図9A)。よって移植した細胞は宿主の精巣内で生着することがわかった。

この細胞が精巣内で、ステロイドホルモン産出細胞(ライディッヒ細胞)に分化しているかどうかを調べるために、抗GFP(図9B)と抗P450_{scc}(図9C)による二重免疫染色を行った。P450_{scc}陽性の多く細胞群がGFP陽性であったことから、Greenラット骨髄

由来の細胞はライディッヒ細胞に分化したことが分かる。

実施例 5

[0023] 実施例4の方法ではマクロファージ系の細胞が残るため幹細胞を完全に純化することはできない。そこで、確立されたマウス成体由来の間葉系幹細胞の細胞株であるKUM9にin vitroでステロイドホルモン産出細胞に分化する能力があることを確かめる実験を行った。

[0024] P450scc(側鎖切断酵素)はミトコンドリア内膜上にあつてコレステロールをプレネグネロンに分解する反応を触媒する酵素である。この分解反応はすべてのステロイドホルモン産出において必要不可欠な過程であることから、P450sccはあらゆるステロイドホルモン産出細胞に発現が見られる。

Chungらのグループは可視化レポーター遺伝子LacZのトランスジェニックマウスを作製することによって、ヒトのP450scc遺伝子(Gene Bank M60421)の5'上流域2.3Kbpが生殖腺及び副腎のステロイドホルモン産出細胞におけるP450scc遺伝子の発現を規定していることを示した(Endocrinology, 140:5609-18, 1999)。従って、この領域のコントロールにより可視化レポーター遺伝子を発現をする幹細胞を作製すれば、ステロイドホルモン産出細胞への分化を検出できると考えられる。

[0025] そこでpEGFP-1ベクター(図10、Clontech)のEGFPタンパク質コーディング領域の上流に、P450scc遺伝子(Gene Bank M60421、配列番号18)を組み込み、さらにピュロマイシン耐性遺伝子をコードするpPURベクター(図11、Clontech)と融合させた。

この合成ベクターをApaL Iで直線化した後に、マウス骨髄間葉系幹細胞由来のKUM9細胞(国立成育医療センター研究所生殖医療研究部から提供された。)にリポフェクションによってトランスフェクションした。この細胞株では、P450sccが発現すると同時に蛍光GFPも発現するので、蛍光を指標にしてフローサイトメーターにより自動的に分化したKUM9由来ステロイド産生細胞を分離できる。

その48時間後からピュロマイシン(2 μ g/ml)入りの培地で選択を行い、2週間後に生き残った耐性コロニーを限界希釈法によってクローン化した。

[0026] クローンを増殖させる過程で倒立蛍光顕微鏡下での観察を行ったところ、単離された250クローンのうちに、2つのクローンにおいて倒立蛍光顕微鏡下でGFP陽性の細

胞が観察された。

GFP陽性の細胞が多数見られたこの2つのクローンに関してフローサイトメーターを使ってGFP陽性と陰性の細胞に分離したところ、2〜5%がGFP陽性であった(図12)。

。

[0027] また、GFP陽性細胞について、P450_{scc}の免疫染色を行ったところ、GFP陽性細胞は免疫染色によってもやはりP450_{scc}陽性であることが確認された(図13)。

[0028] 更に、セルソーターでGFP陽性(scc+)と陰性(scc-)の細胞画分を分離し、分離した細胞からtotal RNAを抽出し、reverse transcriptaseによる逆転写反応を行いcDNAを作製した。各遺伝子に特異的なプライマーによりRT-PCRを行った。その結果、GFP陽性分画の細胞(scc+)には、P450_{scc}遺伝子のmRNAの発現が観察された(図14)。このようにして単離した細胞では、転写因子SF-1が発現していた。さらに、ステロイドホルモン産出に関わる遺伝子の発現を調べたところ、生殖腺・副腎型(HSD3b1)と胎盤型(HSD3b6)の両方の3 β -HSD遺伝子の発現が観察された。

以上の結果から、この移植によりSF-1が幹細胞に発現し、SF-1を介してステロイドホルモン産生細胞に分化するものと考えられる。

図面の簡単な説明

[0029] [図1]pIRES-puro2ベクターを示す図である。

[図2]KUM9(A)に、親ベクター(B)とSF-1発現ベクター(C)を安定導入した細胞を示す図である。

[図3]各細胞株からSF-1タンパク質を検出したウエスタンブロッティングを示す図である。SF-7及びSF-9はそれぞれSF-1導入して新たに確立した7番目及び9番目の細胞株を示す。

[図4]KUM9に親ベクター(pIRES)とSF-1(SF9)を安定導入した細胞株に、cAMPを添加して7日間培養し、抽出されたRNAについてRT-PCRを行った結果を示す図である。日数はcAMP添加後RNA抽出までの日数を示す。HSD3b(3 β -HSD)は3日目に、P450c17とP450c11b1は5日目に発現している。

[図5]図4と同様の培養条件の細胞からタンパク質を抽出して行ったウエスタンブロッティングを示す図である。ポジティブコントロールとしてマウス・ライディッヒ細胞由来の

MA10細胞由来のタンパク質を用いた。

[図6]図4と同じ培養条件の細胞の培養上清を回収し、分泌されたステロイドホルモンの量をRIAによる定量を示す図である。それぞれ示した日の前日に新しい培養液と交換し、24時間以内に産出されるホルモンの量を定量した。

[図7]SF9細胞株をcAMP添加前(−)と添加後7日間(+)培養した後に、抗 β -HSD I抗体による免疫染色を示す図である。DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)はDNAの染色物質であり、核の細胞内局在を示す。

[図8]ヒト骨髓間葉系幹細胞由来のhMSC E6/E7細胞にSF-1を安定導入し、cAMPを添加して7日間培養した細胞からRNAを抽出して行ったRT-PCRを示す図である。

[図9]骨髓由来の間葉系幹細胞を移植した精巢を示す図である。STは精細管(seminiferous tubule)を示す。

[図10]pEGFP-1ベクターを示す図である。

[図11]pPURベクターを示す図である。

[図12]GFP陽性のクローンのフローサイトメトリーを示す図である。

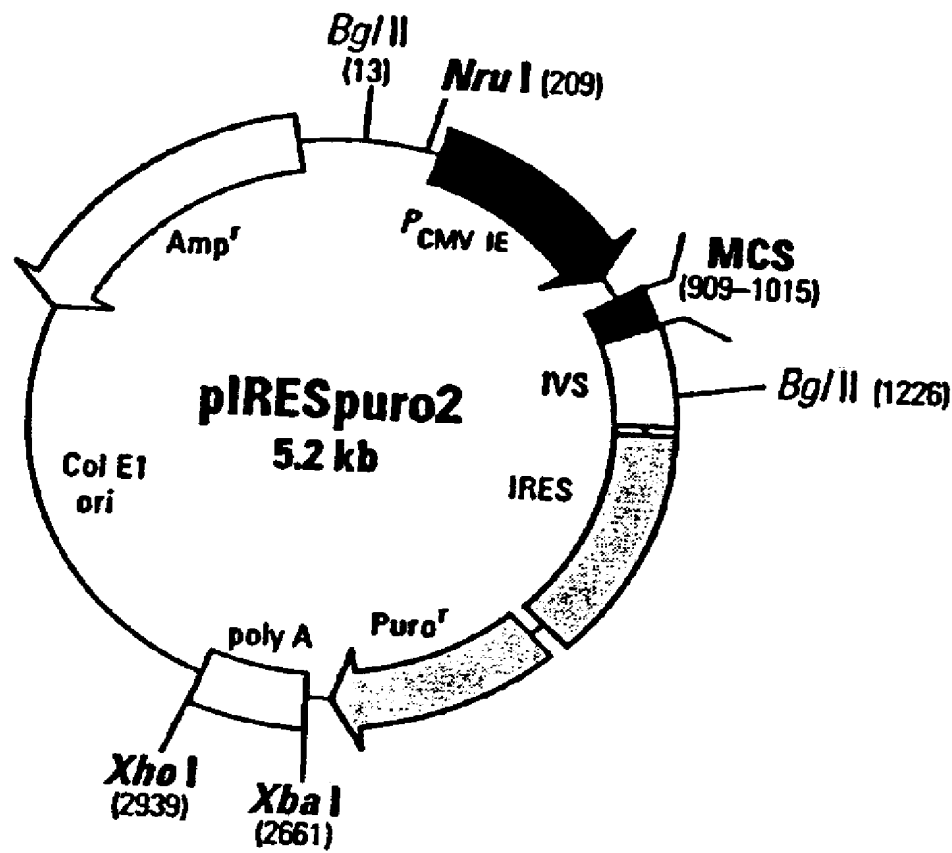
[図13]GFP陽性細胞についてのP450sccの免疫染色を示す図である。

[図14]GFP陽性(scc+)と陰性(scc-)の細胞画分について各酵素のRT-PCRの結果を示す図である。

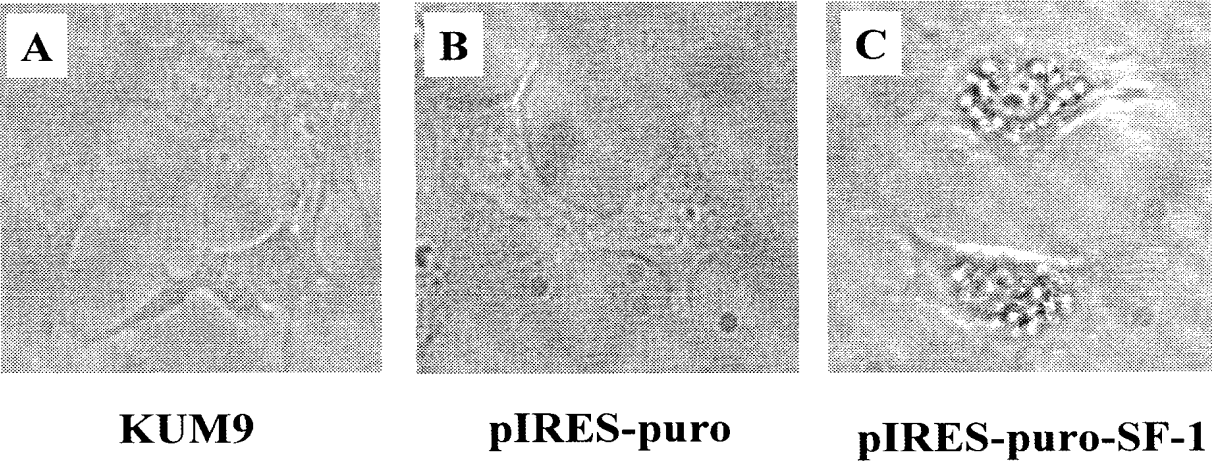
請求の範囲

- [1] 間葉系幹細胞を転写因子(SF-1)で刺激することから成る、骨髄由来の間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる方法。
- [2] 更にcAMPで刺激することから成る請求項1に記載の方法。
- [3] 前記間葉系幹細胞が骨髄由来である請求項1又は2に記載の方法。
- [4] 前記間葉系幹細胞がヒト由来である請求項3に記載の方法。
- [5] in vitroで請求項1〜4のいずれか一項に記載の方法を実施することから成るステロイド産生細胞の製法。
- [6] 前記間葉系幹細胞を哺乳類の生殖器官に移植することから成る、請求項1〜4のいずれか一項に記載のステロイド産生細胞の製法。
- [7] 請求項5又は6の方法から得られるステロイド産生細胞。
- [8] 請求項7に記載のステロイド産生細胞を培養しその培養液からステロイドを回収することから成るステロイドの製法。
- [9] 前記ステロイドが、プロゲステロン、アンドロゲン、エストロゲン、グルココルチコイド又はミネラルコルチコイドである請求項8に記載の方法。
- [10] 請求項7に記載のステロイド産生細胞を有する非ヒト動物。

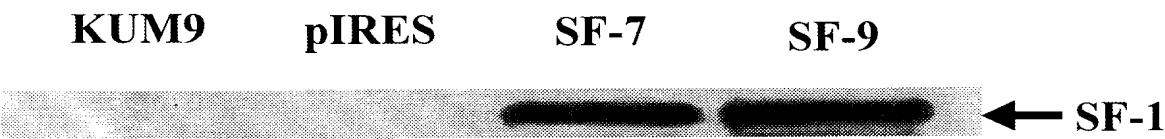
[図1]



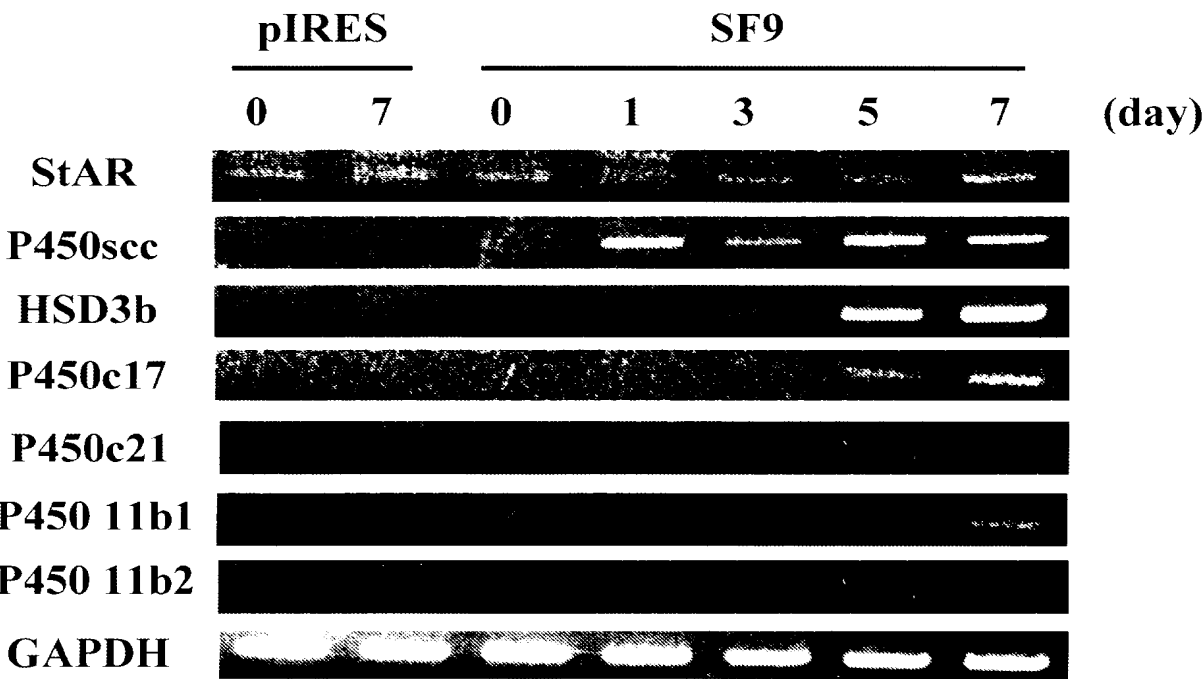
[図2]



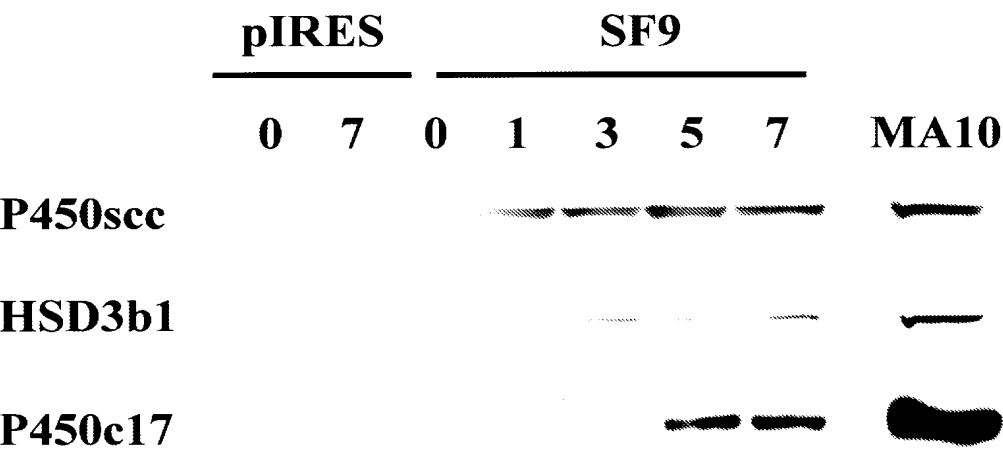
[図3]



[図4]

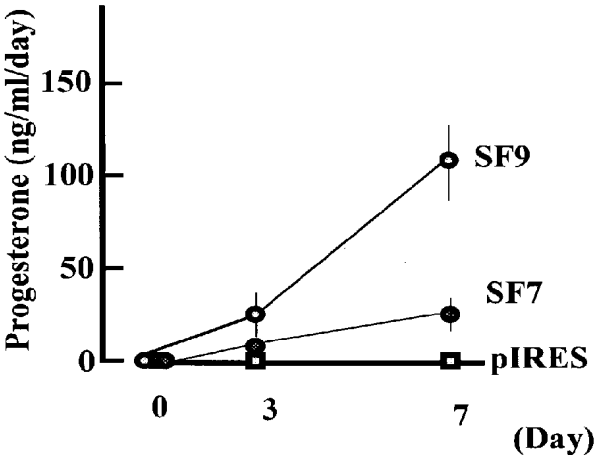


[図5]

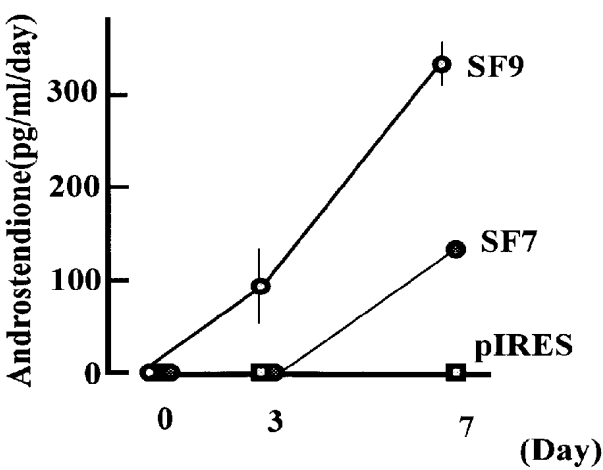


[図6]

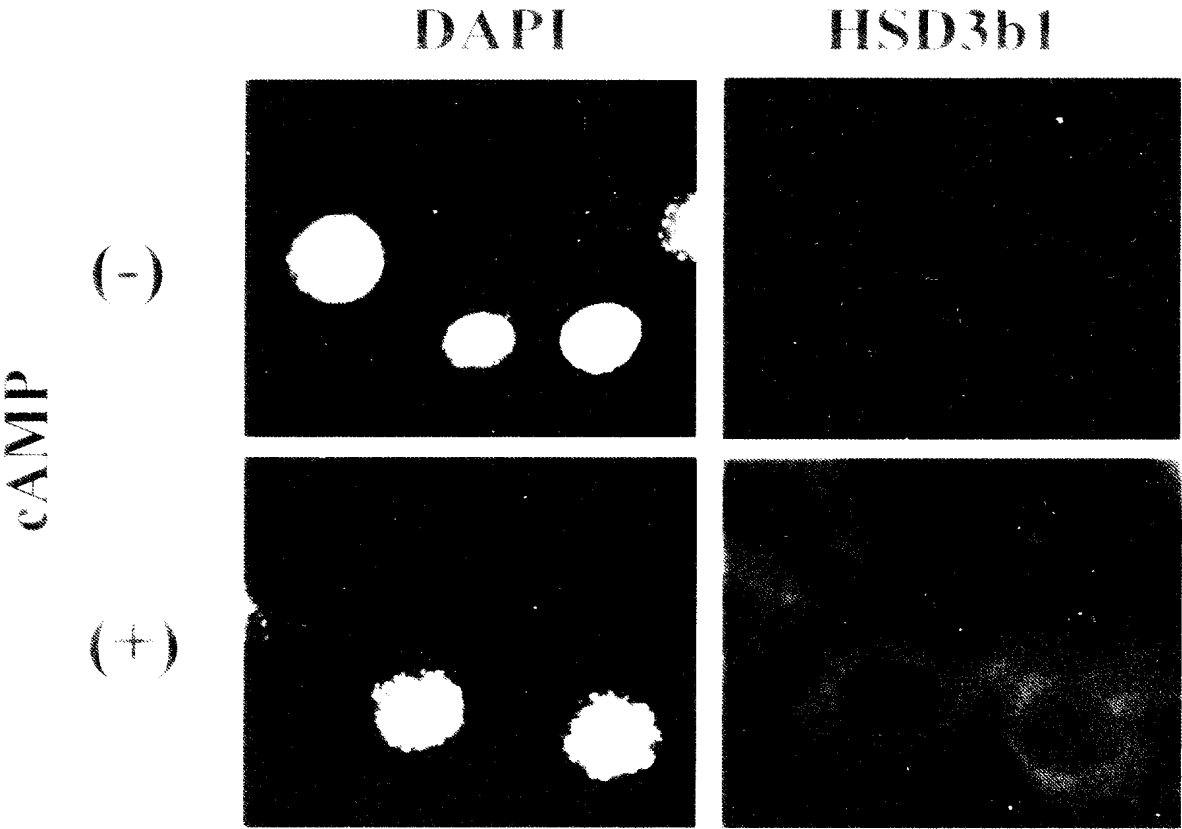
A



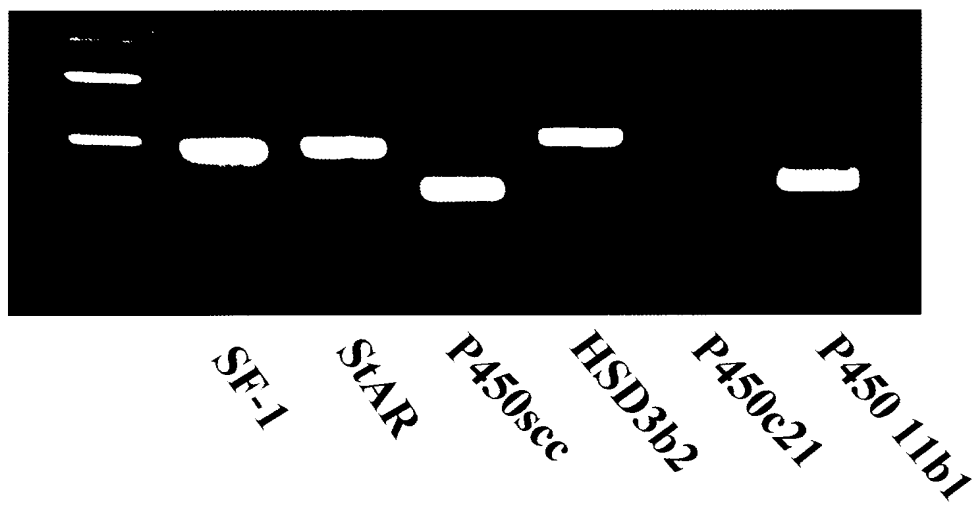
B



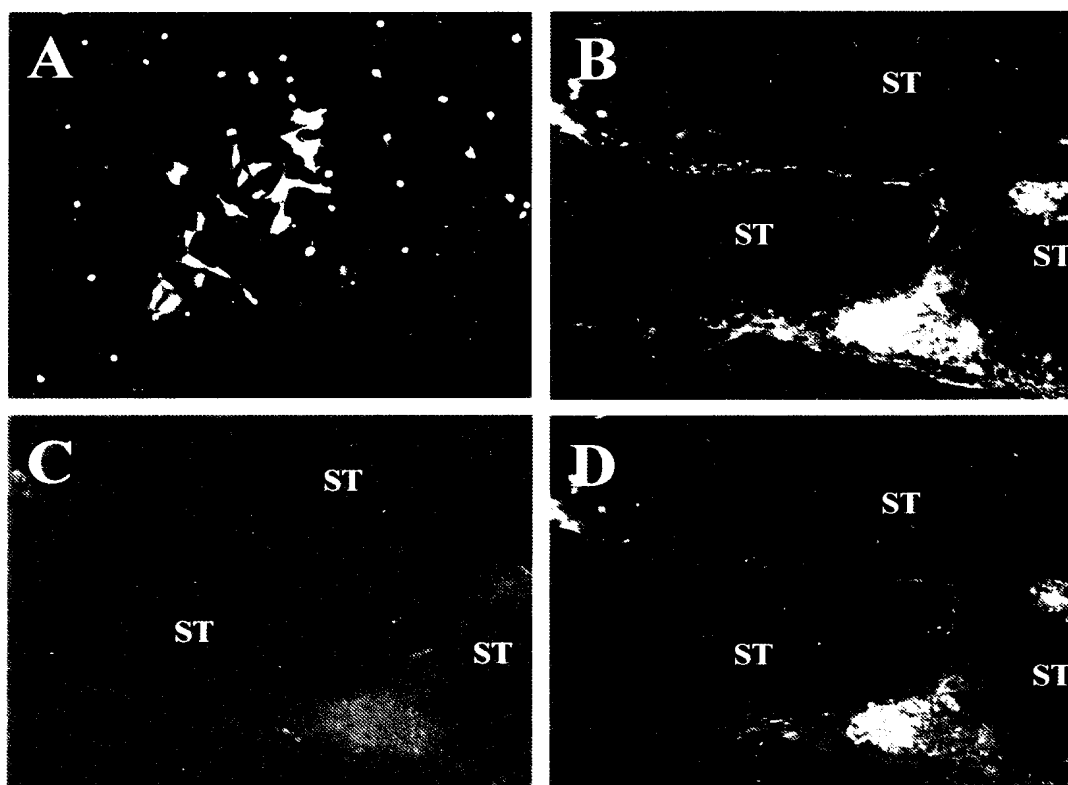
[図7]



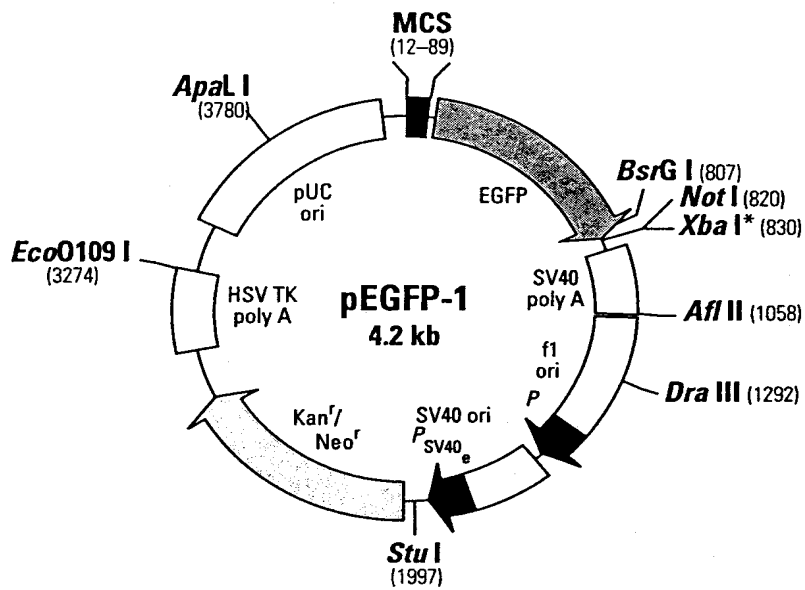
[図8]



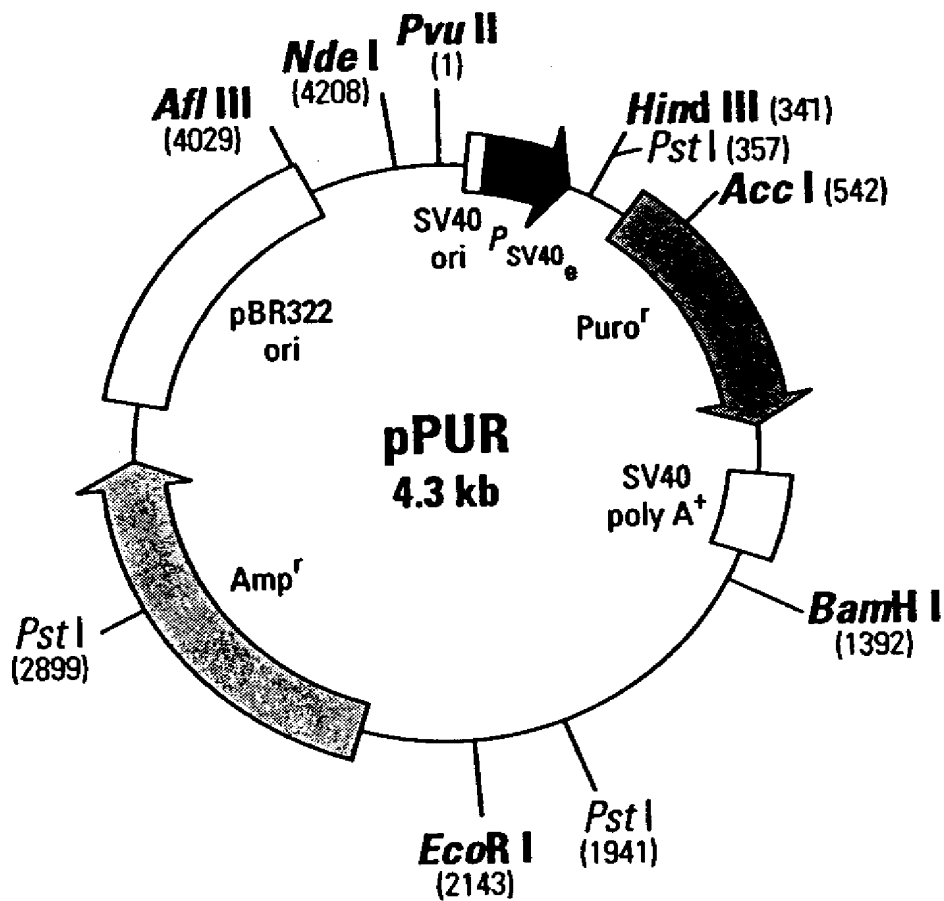
[図9]



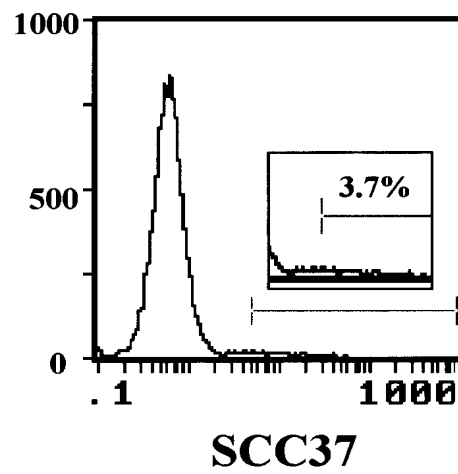
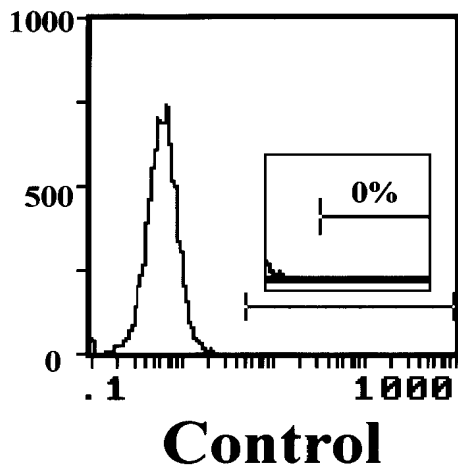
[図10]



[図11]



[図12]

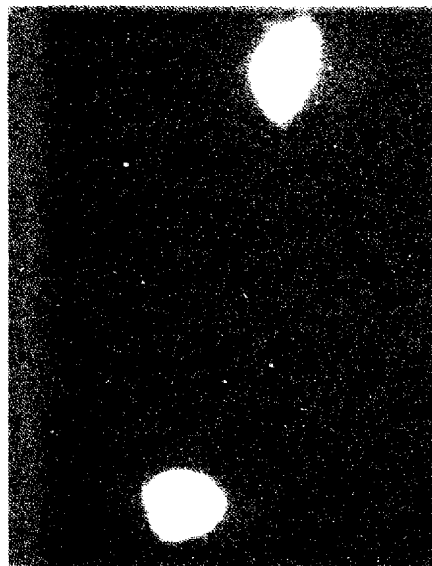


[図13]

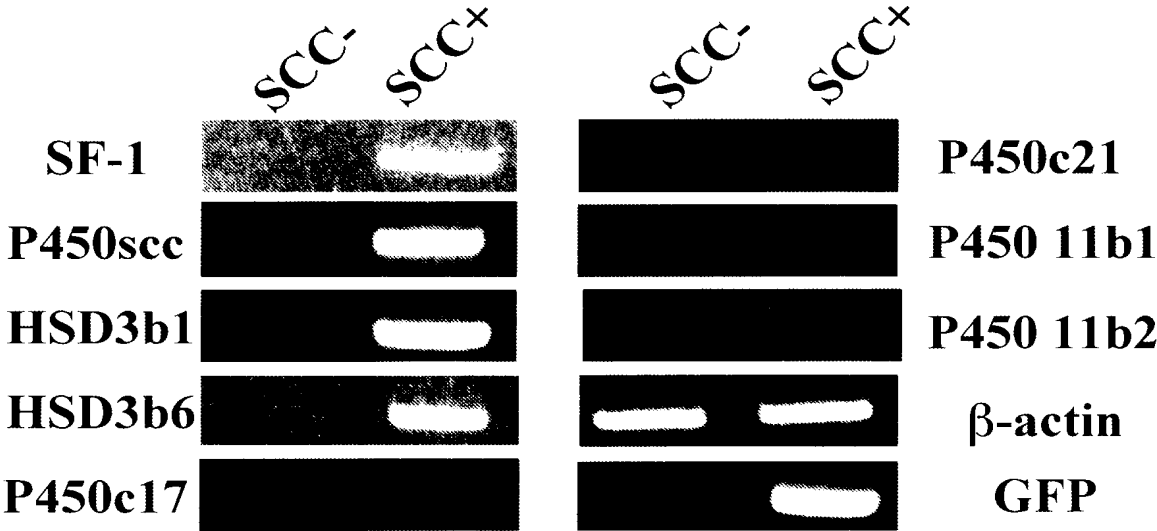
SCC



GFP



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N5/06, C12N5/08, C12N5/10, C12N15/09, C12P33/00, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N5/06, C12N5/08, C12N5/10, C12N15/09, C12P33/00, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Crawford P.A. et al., Nuclear receptor steroidogenic factor 1 directs embryonic stem cells toward the steroidogenic line age, Mol.Cell.Biol., 1997, Vol.17, No.7, pages 3997 to 4006	7/1-6,8-10
Y	Akihiro UMEZAWA, "Tokushu Kansaibo no Hassei Bunka to Sono Kasosei Kotsuzui Kanshitsu Saibo", Cellular molecular medicine, 2001, Vol.2, No.1, pages 17 to 24	1-6,8-10
Y	Hajime OKUSI, "Kan'yokei Kansaibo o Mochiita Saisei Iryo Gijutsu", Bioscience & Industry, 2002, Vol.30, No. 5, pages 318 to 319	1-6,8-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 March, 2005 (04.03.05)

Date of mailing of the international search report

22 March, 2005 (22.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002548

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Akihiro UMEZAWA, "Saisei Iryo System-Sono Kenkyu to Shinpo-Kan'yokei Kansaibo ni yoru 'Zoki' Saikochiku-Atarashii Seitai Micro Device to shiten Kotsuzui Kanshitsu Saibo no Kasosei o Mochiita Saibo Ishoku-", Biotherapy, 2001, Vol.15, No.2, pages 119 to 125	1-6, 8-10
P,X	Takashi YAZAWA et al., "Kotsuzui Yurai no Kan'yokei Kansaibo kara no Steroid Hormone Sansei Saibo no Sakusei", Folia endocrinologica Japonica, 2004 Nen 9 Gatsu, Vol.80, No.2, page 457, WS7-3	1-10
P,X	Gondo S. et al., SF-1/Ad4BP transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells, Genes Cells, 2004 Dec, Vol.9, No.12, pages 1239 to 1247	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/06, C12N5/08, C12N5/10, C12N15/09, C12P33/00, A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/06, C12N5/08, C12N5/10, C12N15/09, C12P33/00, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Crawford P.A. et al., Nuclear receptor steroidogenic factor 1 directs embryonic stem cells toward the steroidogenic line age, Mol Cell Biol, 1997, Vol.17, No.7, pp.3997-4006	7/1-6, 8-10
Y	梅澤明弘, 特集 幹細胞の発生分化とその可塑性 骨髓間質細胞, 分子細胞治療, 2001, Vol.2, No.1, pp.17-24	1-6, 8-10
Y	大串始, 間葉系幹細胞を用いた再生医療技術, バイオサイエンスとインダストリー, 2002, Vol.30, No.5, pp.318-319	1-6, 8-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.03.2005

国際調査報告の発送日

22.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

4 B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	梅澤明弘, 再生医療システムーその研究と進歩ー間葉系幹細胞による「臓器」再構築ー新しい生体マイクロデバイスとしての骨髄間質細胞の可塑性を用いた細胞移植ー, Biotherapy, 2001, Vol.15, No.2, pp.119-125	1-6, 8-10
PX	矢澤隆志他, 骨髄由来の間葉系幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製, 日本内分泌学会雑誌, 2004年9月, Vol.80, No.2, p.457, WS7-3	1-10
PX	Gondo S. et al., SF-1/Ad4BP transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells, Genes Cells, 2004 Dec, Vol.9, No.12, pp.1239-1247	1-10